

Rec'd PCT/PTO 07 SEP 2004  
PCT/JP 03/02657

日 本 国 特 許 庁 10/506807  
JAPAN PATENT OFFICE 06.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2002年10月18日

REC'D 05 MAY 2003

WIPO PCT

出 願 番 号  
Application Number:

特願2002-304709

[ST.10/C]:

[JP2002-304709]

出 願 人  
Applicant(s):

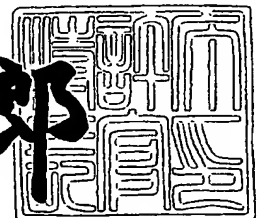
株式会社 エンバイオテック・ラボラトリーズ

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月15日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3027336

【書類名】 特許願

【整理番号】 PEBL8

【提出日】 平成14年10月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/00

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江東区青海 2 丁目 4 5 番地 株式会社エンバイオ  
テック・ラボラトリーズ内

    【氏名】 水上 春樹

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都江東区青海 2 丁目 4 5 番地 株式会社エンバイオ  
テック・ラボラトリーズ内

    【氏名】 西 和人

【特許出願人】

    【識別番号】 399051401

    【氏名又は名称】 株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ

【代理人】

    【識別番号】 100103160

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 志村 光春

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 061920

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 9909455

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 低分子物質検出用器具

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識抗体と、被験試料の反応物を接触させるための、反応物接触部位が設けられている、被験試料中の標的物質を検出可能な、イムノクロマトグラフィーを用いた低分子物質検出用器具。

【請求項 2】 下記の（１）および（２）が設けられている、請求項 1 記載の低分子物質検出用器具。

（１）：標的物質に結合していないフリーの標識抗体を捕捉することが可能な要素を結合状態で含む、未反応標識抗体捕捉部位。

（２）：標識抗体が結合した標的物質と接触すると視覚的な変化を生じる検出要素を含む、検出部位。

【請求項 3】 検出部位における検出要素が、金属コロイド粒子またはラテックス粒子である、請求項 1 または 2 記載の低分子物質検出用器具。

【請求項 4】 検出部位における検出要素が、結合状態で含まれる、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の低分子物質検出用器具。

【請求項 5】 未反応標識抗体捕捉部位における、標的物質に結合していないフリーの標識抗体を捕捉することが可能な要素が、標的物質、または、標的物質の類似物質である、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の低分子物質検出用器具。

【請求項 6】 未反応標識抗体捕捉部位、および、検出部位が、多孔性のクロマトグラフィー用メンブレンに固定化された担体を基材とする、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の低分子物質検出用器具。

【請求項 7】 標的物質が、ダイオキシン類、および／または、PCB 類である、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の低分子物質検出用器具。

【請求項 8】 反応物接触部位において接触させた、被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識抗体と被験試料の反応物中の、標識抗体と標的物質の複合体、および／または、標的物質を結合していないフリーの標識抗体を検出することにより、被験試料中の標的物質の検出を行う、請求項 1 ～ 7 のいずれ

かに記載の低分子検出用器具の使用方法。

【請求項 9】 (1) 請求項 1～8 のいずれかに記載の低分子物質検出器具、および、(2) 被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識抗体を、構成要素として含む、低分子物質検出用セット。

【請求項 10】 被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識抗体が、乾燥状態で保たれている、請求項 9 記載の低分子物質検出用セット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定物質の検出器具に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】

近年、ダイオキシン類、PCB類、その他の環境汚染物質による、環境汚染が深刻化し、人体および生体への影響が懸念されている。これまで、ダイオキシン類等の環境汚染物質の検出方法としては、ガス・クロマトグラフ質量分析法（GC-MS法）を中心とした分析法が用いられてきた。GC-MS法は、公定分析法として用いられており、その感度、精度共、非常に優れた方法であるが、特殊な装置を必要とするために、分析コストが高く、分析の手順自体も煩雑である等の問題点が認められる。

【0003】

ダイオキシン類等の環境汚染物質を、一般的には、GC-MS法よりも簡便な、これらの化学物質に対する抗体を用いるELISA法により、検出を行うことは、上記の問題点の解決手段の一つとして認められている。

【0004】

しかしながら、ELISA法には、定量性に優れ、高感度であるが、通常、サンプルの検出に、特殊な機器を必要とするか、必要としない場合であっても、検出するまでの時間が1時間以上かかる、等の欠点が認められる。これらの欠点を補うため、操作が簡単で、高感度であり、検出時間が短い、免疫クロマトグラフィーが注目されている。

## 【0005】

免疫クロマトグラフィーにおいて最も広く利用されているELISA法の態様としては、被験物質である高分子物質（それ自身で抗原性を有する物質）の異なる部位に結合する2種類の抗体を利用したサンドイッチ法が挙げられる（特許文献1、2等）。このサンドイッチ法を利用した検出器具では、標的物質となっている高分子物質の濃度に比例した強度の着色を生じ、被験物質の検出が容易であることから、病院での臨床検査、家庭での妊娠検査等において、広く普及している。

## 【特許文献1】

特開平10-62420号公報

## 【特許文献2】

特開2001-124771号公報

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

被験物質が、ダイオキシン類やPCB類のように、低分子化合物である場合は、低分子化合物と抗体との分子量の差が著しいため、サンドイッチ法を適用することは困難である。このため、低分子化合物を免疫クロマトグラフィーで検出する際には、標的となる低分子化合物と、低分子化合物もしくは低分子化合物に対する類似化合物を、抗体に対する結合において競合させて、標的低分子化合物を検出する、競合法が適しているとも考えられる。

## 【0007】

しかしながら、競合法を用いた場合は、低分子化合物の濃度に反比例した強度の着色を指標にせざるを得ないため、標的物質の濃度に比例した強度の着色を指標とするサンドイッチ法に比較し、被験物質の判定が煩雑となる。このため、競合法を用いた免疫クロマトグラフィーは、広く普及するに至っておらず、ダイオキシンやPCB等の低分子の環境汚染物質の検出に用いることも困難である。

## 【0008】

このような課題を解決するために、

a) 被験試料を接触させるための「被験試料適用部位」

b) 被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識抗体を非結合状態で含む「標識抗体反応部位」

c) 標的物質に結合していないフリーの標識抗体を捕捉することが可能な要素を結合状態で含む「未反応標識抗体捕捉部位」

d) 標識抗体が結合した標的物質と接触すると視覚的な変化を生じる検出要素を含む「検出部位」

の a) ～ d) が設けられた、低分子物質検出用器具を提供することは、非常に有益である、と考えられる。

#### 【0009】

しかしながら、このような低分子物質検出用器具においては、検出感度が期待するほどには上がりにくい、という問題点が生ずる傾向が認められる。

すなわち、このような低分子検出用器具では、

1) 被験試料を、被験試料適用部位に接触させると、被験試料における溶媒と共に、標識抗体反応部位の標識抗体が、メンブレン上の未反応標識抗体捕捉部位に、一気に到達するため、標識抗体反応部位の標識抗体の量を十分とすると、未反応の標識抗体のすべてを、捕捉部位において捕捉することが困難となり、被験試料中に、標的物質が存在しない場合であっても、検出部位において、擬陽性反応が起こってしまう懸念が認められる。

#### 【0010】

2) 標識抗体反応部位の標識抗体のメンブレンへのリリースを促進させるため、界面活性剤処理を行うと、本来起こるべき抗原抗体反応が阻害され、被験試料中に標的物質が存在しない場合であっても、未反応標識抗体のすべてが捕捉部位で捕捉されず、検出部位において擬陽性反応が起こってしまう懸念が認められる。

#### 【0011】

3) 被験試料を被験試料適用部位に接触させる際に、被験試料における溶媒と共に、標識抗体反応部位の標識抗体が、一気にメンブレン上を移動するため、標識抗体と反応可能な被験試料中の標的物質は一部のみとなり、たとえ、被験試料の量を増やしても、検出感度の上昇にはつながり難い傾向が認められる。

等の問題点が生ずる傾向が認められる。

【0012】

本発明は、このような低分子化合物検出用の免疫クロマトグラフィーが有する問題点を考慮しつつ、被験物質中の標的物質であるダイオキシン類等の環境汚染物質に代表される低分子物質の検出手段を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題の解決に向けて、鋭意検討を行った結果、被験試料を、直接に被験試料適用部位に接触させるのではなく、予め、被験試料と標識抗体を接触させて得られる反応物を、被験対象物として扱うことで、かかる課題を解決し得ることを見だし、本発明を完成した。

【0014】

すなわち、本発明は、被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識抗体（本明細書において、標識抗体ともいう）と、被験試料の反応物を接触させるための、反応物接触部位が設けられている、被験試料中の標的物質を検出可能な、イムノクロマトグラフィーを用いた低分子物質検出用器具（以下、本検出用器具ともいう）、を提供する発明である。

【0015】

また、本発明は、本検出用器具の使用方法（以下、本使用方法ともいう）と、本使用方法を行うための検出用セット（以下、本検出用セットともいう）を提供する発明である。

【0016】

なお、本発明における被験試料は、低分子物質を含み得る試料であれば限定されず、特に、ダイオキシン類やPCB類等の環境関連低分子物質を含み得る試料が、好適な対象となる。例えば、大気、土壌、湖水や海水等の水試料等が挙げられる。被験試料には、その性質に応じて、様々の前処理、例えば、希釈処理、クリーン・アップ、濾過処理、濃縮処理等を行ったものも含めるものとする。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を説明する。

第1図は、本検出用器具の一実施態様を示した図面（上面図）であり、第2図は、第1図の本検出器具10を、実線I-I'に沿って横断して示した横断面図である。

【0018】

本検出用器具10において、反応物接触部位1、メンブレン5、および、吸収部位4は、各々、細長形状の薄膜6の上面に全部または一部が、接着している。また、未反応標識抗体捕捉部位2と検出部位3は、メンブレン5上に、各々、設けられている。

【0019】

より詳細には、まず、薄膜6の一端に、反応物接触部位1の一端側が接着されている。これに対して、反応物接触部位1の他端側は、その一端が反応物接触部位1の薄膜6との接着部分（反応物接触部位1の一端側）と隣合って、その全面が薄膜6に接着されているメンブレン5の、一端側の上面に被さって、メンブレン5と接触している。薄膜6の他端側には、吸収部位4の一端側が接着されており、この吸収部位4の他端側は、メンブレン5の他端側の上面に被さって、メンブレン5と接触している。

【0020】

未反応標識抗体捕捉部位2と検出部位3は、両者共、これらの部位を構成する化学成分を、メンブレン5に固定することにより、メンブレン5において設けられている。

【0021】

本検出用器具10は、被験試料を、そのまま、被験試料適用部位等に接触させるのではなく、予め、被験試料と標識抗体を接触させて得た反応物を、反応物接触部位1に接触させることを前提とする、イムノクロマトグラフィーを用いた検出用器具である。この点において、本検出用器具10は、被験試料を、そのまま被験試料適用部位に接触させる、従来のイムノクロマトグラフィーを用いた検出用器具と異なっている。

【0022】



このことにより、被験試料と標識抗体を十分に反応させることが可能になり、この反応を行った反応物を、本検出用器具10に対して用いることにより、標識抗体が、一気に未反応標識抗体捕捉部位に到達するのを抑制することが可能となり、上述した擬陽性反応が抑制されて、検出感度が向上し、例えば、環境中における極微量の存在が問題となる低分子物質を、簡便、かつ、鋭敏に検出することが可能である。

## 【0023】

本検出器具10において、上記の反応物は、これを接触させる反応物接触部位1から吸収部位4に向けて、毛細管現象により移動して、被験試料中の低分子物質の検出が行われる（以下、本検出用器具の反応物接触部位側を「上流」、同吸収部位側を「下流」ともいう）。第1図および第2図において、上流から下流への反応物の移動方向は、矢印9により示される。

## 【0024】

被験試料中に含まれ得る標的物質は、微量成分として生活環境に存在する低分子人工化学物質（以下、これらの物質を、「環境汚染物質」と総称することもある）である。環境汚染物質としては、特に、いわゆる「環境ホルモン」として、内分泌攪乱作用が疑われる物質が、好適な対象として挙げられる。具体的には、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニール（PCB）類、ポリ臭化ビフェニール（PBB）類、ヘキサクロロベンゼン（HCB）、ペンタクロロフェノール（PCP）、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、アミトロール、アトラジン、アラクロール、CAT（シマジン）、ヘキサクロロシクロヘキサン、エチルパラチオン、NAC（カルバリル）、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、1,2-ジブromo-3-クロロプロパン、DDT（ジクロロジフェニルトリクロロエタン）、DDE（ジクロロジフェニルトリクロロエチレン）、DDD（ジクロロジフェニルジクロロエタン）、ケルセン、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、エンドスルファン（ベンゾエピン）、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシサイド、マラチオン、メソミル、メトキシクロル、マイレックス、ニトロフェン、トキサフェン、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、トリフルラリン、アルキルフェノール（C5～C9）ノニルフェノール、オクチ

ルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、ベンゾ(a)ピレン、2,4-ジクロロフェノール、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、アルディカーブ、ペノミル、キーボン(クロルデコン)、マンゼブ(マンコゼブ)、マンネブ、メチラム、メトリブジン、シベルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート、ペルメトリン、ピンクロゾリン、ジネブ、ジラム、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル等が挙げられる。

## 【0025】

上に列挙した環境汚染物質の中でも、最も典型的には、ダイオキシン類やPCB類が挙げられる。ダイオキシン類としては、例えば、ダイオキシン類特別措置法で指定されている29種類のダイオキシン類を挙げることができる。すなわち、2,3,7,8- $T_4$ CDD、1,2,3,7,8- $P_5$ CDD、1,2,3,4,7,8- $H_6$ CDD、1,2,3,6,7,8- $H_6$ CDD、1,2,3,7,8,9- $H_6$ CDD、1,2,3,4,6,7,8- $H_7$ CDD、1,2,3,4,6,7,8,9- $O_8$ CDD等のジベンゾダイオキシン類；3,4,4',5- $T_4$ CB、3,3',4,4'- $T_4$ CB、3,3',4,4',5- $P_5$ CB、3,3',4,4',5,5'- $H_6$ CB、2,3,3',4,4'- $P_5$ CB、2,3,4,4',5- $P_5$ CB、2,3',4,4',5- $P_5$ CB、2',3,4,4',5- $P_5$ CB、2,3,3',4,4',5- $H_6$ CB、2,3,3',4,4',5'- $H_6$ CB、2,3',4,4',5,5'- $H_6$ CB、2,3,3',4,4',5,5'- $H_7$ CB等のコプラナーPCB類；2,3,7,8- $T_4$ CDF、1,2,3,7,8- $P_5$ CDF、2,3,4,7,8- $P_5$ CDF、1,2,3,4,7,8- $H_6$ CDF、1,2,3,6,7,8- $H_6$ CDF、1,2,3,7,8,9- $H_6$ CDF、2,3,4,6,7,8- $H_6$ CDF、1,2,3,4,6,7,8- $H_7$ CDF、1,2,3,4,7,8,9- $H_7$ CDF、1,2,3,4,6,7,8,9- $O_8$ CDF等のジベンゾフラン類等が挙げられる。

## 【0026】

PCB類としては、例えば、2-Monochlorobiphenyl、3-Monochlorobiphenyl、4-Monochlorobiphenyl；

2,2'-Dichlorobiphenyl、2,3-Dichlorobiphenyl、2,3'-Dichlorobiphenyl、2,4-Dichlorobiphenyl、2,4'-Dichlorobiphenyl、2,5-Dichlorobiphenyl、2,6-Dichlorobiphenyl、3,3'-Dichlorobiphenyl、3,4-Dichlorobiphenyl、3,4'-Dic

hlorobiphenyl、3,5-Dichlorobiphenyl、4,4'-Dichlorobiphenyl；

【 0 0 2 7 】

2,2',3-Trichlorobiphenyl、2,2',4-Trichlorobiphenyl、2,2',5-Trichlorobiphenyl、2,2',6-Trichlorobiphenyl、2,3,3'-Trichlorobiphenyl、2,3,4-Trichlorobiphenyl、2,3,4'-Trichlorobiphenyl、2,3,5-Trichlorobiphenyl、2,3,6-Trichlorobiphenyl、2,3',4-Trichlorobiphenyl、2,3',5-Trichlorobiphenyl、2,3',6-Trichlorobiphenyl、2,4,4'-Trichlorobiphenyl、2,4,5-Trichlorobiphenyl、2,4,6-Trichlorobiphenyl、2,4',5-Trichlorobiphenyl、2,4',6-Trichlorobiphenyl、2',3,4-Trichlorobiphenyl、2',3,5-Trichlorobiphenyl、3,3',4-Trichlorobiphenyl、3,3',5-Trichlorobiphenyl、3,4,4'-Trichlorobiphenyl、3,4,5-Trichlorobiphenyl、3,4',5-Trichlorobiphenyl；

【 0 0 2 8 】

2,2',3,3'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,4-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,4'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,5-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,6-Tetrachlorobiphenyl、2,2',3,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,5-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,6-Tetrachlorobiphenyl、2,2',4,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',5,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,2',6,6'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',4-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',4'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',5-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',5'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,3',6-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4,4'-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4,5-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4',5-Tetrachlorobiphenyl、2,3,4',6-Tetrachlorobiphenyl、2,3,5,6-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,5-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4,6-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4',5-Tetrachlorobiphenyl、2,3',4',6-Tetrachlorobiphenyl、2,3',5,5'-Tetrachlorobiphenyl、2,3',5',6-Tetrachlorobiphenyl、2,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl、2,4,4',6-Tetrachlorobiphenyl、2',3,4,5-Tetrachlorobiphenyl、3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl、3,3',4,5-Tetrachlorobiphenyl、3,3',4,5'-Tetrachlorobiphenyl

achlorobiphenyl、3,3',5,5'-Tetrachlorobiphenyl、3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl ;

## 【 0 0 2 9 】

2,2',3,3',4-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,3',5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,3',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,4'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,5'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5,6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,5',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',3,6,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',3',4,5-Pentachlorobiphenyl、2,2',3',4,6-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,5,6'-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,5',6-Pentachlorobiphenyl、2,2',4,6,6'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,5-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4',5-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,5'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4,6-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',4',6-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',5,6-Pentachlorobiphenyl、2,3,3',5',6-Pentachlorobiphenyl、2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,3,4,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,3,4,5,6-Pentachlorobiphenyl、2,3,4',5,6-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,4',6-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2,3',4,5',6-Pentachlorobiphenyl、2',3,3',4,5-Pentachlorobiphenyl、2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl、2',3,4,5,5'-Pentachlorobiphenyl、2',3,4,5,6'-Pentachlorobiphenyl、3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl、3,3',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl ;

## 【 0 0 3 0 】

2,2',3,3',4,4'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,

2',3,3',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,3',6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',4,5-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,4,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,5',6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4,6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',5',6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,5,5',6-Hexachlorobiphenyl、2,2',3,5,6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,2',4,4',5,6'-Hexachlorobiphenyl、2,2',4,4',6,6'-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',5-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,5,6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4,5',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',4',5',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,3',5,5',6-Hexachlorobiphenyl、2,3,4,4',5,6-Hexachlorobiphenyl、2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl、2,3',4,4',5',6-Hexachlorobiphenyl、3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl ;

【 0 0 3 1 】

2,2',3,3',4,4',5-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,5'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,6,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',4',5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',6,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4,5,6,6'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3,4',5,6,6'-Heptachlorobiphenyl

enyl、2,2',3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,4',5,6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4,5,5',6-Heptachlorobiphenyl、2,2',3',4',5,5',6-Heptachlorobiphenyl ;

## 【 0 0 3 2 】

2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',5,6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',5',6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,5',6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5',6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,3',5,5',6,6'-Octachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,5',6-Octachlorobiphenyl、2,2',3,4,4',5,6,6'-Octachlorobiphenyl、2,3,3',4,4',5,5',6-Octachlorobiphenyl ;

## 【 0 0 3 3 】

2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,4',5,6,6'-Nonachlorobiphenyl、2,2',3,3',4,5,5',6,6'-Nonachlorobiphenyl ; Decachlorobiphenyl等が挙げられる。

## 【 0 0 3 4 】

なお、上述したような、本検出用器具において用いるべき、ダイオキシン類やPCB類に対する抗体を調製する場合の指針は、被験試料におけるダイオキシン類やPCB類の毒性を推定する場合と、これらの環境汚染物質の総量を推定する場合とでは、標的物質として好適な異性体が異なる。例えば、被験試料のダイオキシン類による毒性を推定する場合は、被験物質中のダイオキシン類の全毒性に占める割合が高い、1,2,3,7,8-P<sub>5</sub>CCD、2,3,4,7,8-P<sub>5</sub>CDF、または、3,3',4,4',5-P<sub>5</sub>CBDD等を標的物質とするのが好適である。また、被験試料におけるダイオキシン類の総量を推定する場合には、ダイオキシン類として被験試料中に含まれる濃度が高い傾向が強い、1,2,3,4,6,7,8,9-O<sub>8</sub>CDD、1,2,3,4,6,7,8,9-O<sub>5</sub>CDF、または、2,3',4,4',5-P<sub>5</sub>CB等を標的物質とすることが好適である。

## 【 0 0 3 5 】

本発明においては、標識抗体と被験試料は、本検出用器具とは別個に反応させ

る故に、標識抗体は、本検出用器具の必須ではないが、本検出用器具を用いて、低分子物質を検出するには必須である。

## 【0036】

すなわち、本発明は、反応物接触部位において接触させた、被験試料中の標的物質に結合し得る標識抗体と被験試料の反応物中の、標識抗体と標的物質の複合体、および／または、標的物質を結合していないフリーの標識抗体を検出することにより、被験試料中の標的物質の検出を行う、本検出用器具の使用方法（本使用方法）を提供する発明である。

## 【0037】

また、本使用方法を行うための、本検出用器具および標識抗体を、構成要素として含む低分子物質検出用セット（本検出用セット）を提供する発明である。

好適には、本検出用セットの一要素として用いられ得る、標識抗体の一部として用いることが可能な抗体、すなわち、被験試料中の標的物質に結合し得る抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、検出の対象とする環境汚染物質等の低分子物質を選んで、これを免疫抗原（必要に応じて、目的とする環境汚染物質をターゲットとしたハプテンをキャリアタンパクと結合させたものとすることも可能である）として、常法により製造して用いることができる。

## 【0038】

すなわち、上記抗体がポリクローナル抗体の場合には、目的とするダイオキシン類やPCB類等を免疫抗原として免疫した動物に由来する免疫血清から製造することが可能であり、同じくモノクローナル抗体の場合には、ポリクローナル抗体と同様の方法で、免疫した動物の免疫細胞と動物の骨髄腫細胞とのハイブリドーマを作出し、これにより目的とするダイオキシン類やPCB類等を認識する抗体を産生するクローンを選択し、このクローンを培養することにより製造することができる。

## 【0039】

免疫される動物も特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることができるが、モノクローナル抗体を製造する場合には、細胞融合に用いる

骨髓腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。

【0040】

免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等で投与することにより行うことができる。

より具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に2～4週間毎に上記手段により数回投与し、ポリクローナル抗体製造のための免疫血清又はモノクローナル抗体製造のための免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

【0041】

モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髓腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/O-Ag14, P3-NS1-1-Ag4-1, MPC11-45, 6, TG1.7 (以上、マウス由来); 210, RCY, Ag1.2, 3 (ラット由来); SKO-007, GM15006TG-A12 (以上、ヒト由来) 等を用いることができる。

【0042】

上記免疫細胞とこの骨髓腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256, 495 (1975)) 等に準じて行うことができる。

【0043】

より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG), センダイウイルス (HVJ) 等の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

【0044】

所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT (ヒポキサンチン, アミノプテリン及びチミジン) 培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈



法により目的とするモノクローナル抗体の検索及び単一クローン化に供することができる。

【0045】

目的とするモノクローナル抗体産生株の検索は、例えばELISA法、プレート法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー法、RIA法等の一般的な検索法に従い行うことができる。

【0046】

このようにして得られる環境汚染物質を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体窒素中で長時間保存することもできる。

【0047】

このハイブリドーマからの目的とするモノクローナル抗体の採取は、ハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマを、このハイブリドーマに対して適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

【0048】

このようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。

【0049】

標識抗体の標識としては、例えば、金コロイド粒子等の金属コロイド粒子、ラテックス粒子、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の発色機能を有する酵素等を用いることができる。すなわち、これらの標識と抗体を、常法により結合させて、標識抗体として用いることができる。

【0050】

標識抗体は、乾燥状態で保たれていることが好適であり、例えば、安定化剤として、各種の糖、界面活性剤、グリセロール等の多価アルコール等と共存させ、熱、真空または凍結等の手段により乾燥を行い、乾燥状態となった標識抗体7を、例えば、密閉状態とすることが可能な容器8中において、好適には、乾燥剤を

用いて、乾燥状態を保ちつつ保存することが好適である（第3図：本検出用器具10と標識抗体7を封入した容器8のセットが、本検出用セットの典型的な態様である）。

#### 【0051】

本検出用器具10、または、これを構成要素として含む本検出用セットを用いて、本検出方法により、被験試料中の標的物質の検出を試みる場合、被験試料中に標的物質が存在する場合には、反応物中に存在する、標識抗体と標的物質が結合した標識複合体とフリーの標識抗体が、共に、下流に向けて移動する。これに対して、標的物質が被験試料中に存在しない場合には、反応物中にも標識複合体は存在せず、フリーの標識抗体のみが下流に向けて移動する。

#### 【0052】

上述したように、本検出用器具10においては、メンブレン5（毛細管現象により、液相の移動が可能な素材、例えば、多孔性のクロマトメンブレン、ニトロセルロースメンブレン等が好適である。特に、多孔性のクロマトメンブレンは、多孔性故、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の蛋白質や、金コロイド粒子等の金属コロイド粒子、ラテックス粒子等の標識がメンブレン中を容易に移動可能であり、好適である。）上に、未反応標識抗体捕捉部位2と検出部位3が、上流から下流に向けて設けられている。

#### 【0053】

毛細管現象により、上流から移動してきた、標識複合体および／またはフリーの標識抗体は、まず、未反応標識抗体捕捉部位2に接触する。未反応標識抗体捕捉部位には、文字通り、未反応のフリーの標識抗体のみを捕捉することができる機能が付与されている。かかる機能の態様としては、標識抗体の一部を構成する標的物質に対する抗体が反応して結合することが可能な物質、具体的には、標的物質そのもの、または、このような結合反応が認められる標的物質の類似物質を挙げることができる。未反応標識抗体捕捉部位2では、これらの標的物質等が、液相の移動に伴って、移動することのないよう、結合状態であることが必要である。標的物質は、低分子物質であるため、所望の結合状態とするためには、例えば、BSA等のキャリア蛋白に、標的物質等を結合させ、この蛋白結合させた標

的物質等を、蛋白固定の常法により、未反応標識抗体捕捉部位 2 に、結合状態で定着させることが好適である。

【0054】

このように、未反応標識抗体捕捉部位 2 には、未反応のフリーの標識抗体のみを捕捉することができる機能が備わっており、被験試料中に標的物質が存在する場合には、上流より移動してきた標識複合体およびフリーの標識抗体のうち、フリーの標識抗体のみが捕捉され、標識複合体のみが、下流に移動する。また、被験試料中に標的物質が存在しない場合には、移動するのは、フリーの標識抗体のみである。よって、標識抗体の、ほとんど全てが、未反応標識抗体捕捉部位 2 において捕捉され、下流に移動するほとんどが、標識抗体を含まない液相となる。

【0055】

次いで、未反応標識抗体捕捉部位 2 を通過した液相は、その下流に設けられている、検出部位 3 に接触する。検出部位 3 では、標識抗体において用いた標識を顕在化させる、標識顕在化機能が備わっている。かかる標識顕在化機能は、用いた標識に対応する顕在化機能である。顕在化機能としては、例えば、標識複合体が、当初から目視可能な標識（例えば、金コロイド粒子等）である場合には、標識複合体を凝縮した形態で捕捉可能な検出要素、例えば、用いた環境汚染物質に特異的な抗体に対して特異的な抗体、すなわち、抗イムノグロブリンを用いることが好適である。この抗イムノグロブリン抗体は、用いた環境汚染物質に特異的な抗体のパラトープ（抗原結合部位）以外の箇所に対して結合する抗体（例えば、抗 Fc 抗体等）を用いることが好適である。

【0056】

このような、抗イムノグロブリン抗体を、検出要素として、稠密的に検出部位 3 において固定化することにより、液相と共に移動してきた標識を濃縮・顕在化することが可能となる。

【0057】

また、例えば、用いた標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の発色機能を有する酵素のように、検出部位 3 において、酵素基質の接触による発色等を行うことが必要な場合には、検出部位 3 における検出要素は、単に、抗イムノグロブリン

ン抗体ではなく、用いた標識を顕在化させる試薬等が結合した態様であることが好適である。このような場合に、検出要素として、単に、発色機能を有する上記酵素等を用いる場合は、後で、改めて発色反応等を行わなければならない、取扱いが煩雑になってしまう。

## 【0058】

なお、いずれの例においても、抗イムノグロブリン抗体等の検出要素は、毛細管現象により、液相と共に検出部位3から移動しない、結合状態で含まれることが、標識を顕在化させる上で好適である。この結合状態の態様は、結果として、検出要素が、液相の移動と共に、検出部位3から移動しない状態が提供されれば特に限定されず、例えば、検出要素として、検出対象となる環境汚染物質に特異的な抗体のパラトープ以外の箇所に対して結合する抗体である場合は、その抗体の溶液を、検出部位3に該当する部分に滴下することにより、所望する結合状態が提供される。

## 【0059】

また、吸収部位4は、毛細管現象により、上流から下流に移動してきた液相を、最終的に吸収する部位である。この吸収部位4は、本検出器具においては、選択的要素であるが、被験試料を、さらに容易にメンブレンを移動させるために、設けることが好適である。

## 【0060】

以上、記載したように、本検出器具10においては、被験試料中に標的物質が含まれている場合には、標的物質は、容器8中において、低分子化合物である標的物質と特異的に反応する標識抗体7と、標識複合体を形成する。かかる標識複合体は、反応物接触部位1に接触した後、さらにメンブレン5上を移動するが、未反応標識抗体捕捉部位2では捕捉されず、検出部位3に達する。検出部位3では、標識複合体を顕在化する物質が固定化されているため、標識複合体は、検出部位3で濃縮され、目視可能なバンドとして検出される。

## 【0061】

一方、被験試料中に、標的物質が含まれていない場合は、標識抗体反応部位2で、上記の標識複合体は形成されず、フリーの標識抗体が、液相と共に移動する

。このフリーの標識抗体の、ほとんど全てが、未反応標識抗体捕捉部位2で捕捉され、検出部位3には、標識抗体は、ほとんどが到達せず、その結果、標識抗体のバンドは検出部位3においては、ほとんど検出されない。

## 【0062】

このように、本検出用器具10、または、これを要素として含む本検出用セットによって、本使用方法を行うことにより、環境汚染物質等を、ポジティブな指標により検出することが可能であり、かつ、上述したように、従来のこのような方式のイムノクロマトグラフィーを用いた検出用器具において認められがちであった、過剰のフリーの標識抗体等による擬陽性反応を抑制することが可能となる。

## 【0063】

なお、この本検出用器具10は、本発明の一実施態様であり、本発明の範囲内において、他の態様をとることが可能である。例えば、メンブレン上に、反応物（標識複合体）が捕捉されるラインのみを、結合状態で含み、このラインで捕捉されない標識抗体を検出することにより、標的物質をネガティブな指標により検出する、イムノクロマトグラフィー等にも利用可能である。

## 【0064】

## 【実施例】

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

1. C o - P C B # 1 1 8 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 作 製 の た め の 免 疫 抗 原 の 調 製

C o - P C B # 1 1 8 を ターゲットとした低分子化合物、6-[3,2',4',5'-Tetrachlorobiphenyl-4-yl]oxy] hexanoic acid (低分子化合物118)は、既に報告されている、Ya-Wen Chiu ら (Analytical Chemistry, 1995, 67, 3829) における、6-[(3,3',4'-Trichlorobiphenyl-4-yl)oxy] hexanoic acid の合成法に若干の改善を加え、合成を行った。

## 【0065】

得られた低分子化合物は、N-hydroxysuccinimideを用いたNHS エステル法(P. Schneider and B.D. Hammock, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 2, 85)により、カプトガニヘモシアニン (K L H) と結合させ、C o - P C B # 1 1

8モノクローナル抗体作製のための抗原として利用した。

【0066】

## 2. C o - P C B # 1 1 8モノクローナル抗体作製

上記方法により作製、精製したC o - P C B # 1 1 8低分子化合物-K L Hコンジュゲートを、b a l b / cマウスにRibi Adjuvant System (C o r i x a社製)とともに、2週間おきに最大8回の免疫を行い、尾静脈に追加免疫を行った後、通常法により、脾臓中の抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行った。得られたハイブリドーマは、培養上清をC o - P C B # 1 1 8低分子化合物蛋白コンジュゲートを固相化したプレートを用いてスクリーニングを行い、C o - P C B # 1 1 8に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。

【0067】

本実験に使用する抗体は、得られたハイブリドーマをプリスタン処理したマウス腹腔に投与し、通常法により腹水を採取後、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製したものを利用した。

【0068】

## 3. クロマトメンブレンの未反応標識体反応部位に固相化するための低分子化合物-蛋白質コンジュゲート調製

上記方法1において合成した低分子化合物118を、上記方法1と同様の手法でウシ血清アルブミン(BSA)と結合させ、透析により精製を行った後、クロマトメンブレンの未反応標識抗体捕捉部位に固定化するための低分子化合物-蛋白質コンジュゲートとして利用した。

【0069】

## 4. クロマトメンブレンの調整

ハイフロープラスメンブレン: H F 9 0 (25mm×30cm、ミリポア社)の下端から5mmの位置に未反応標識抗体捕捉部位として、上記方法3にて合成した低分子化合物118・BSAコンジュゲートを塗布し、また、下端から15mmの位置に検出部位として、抗マウスI g Gウサギ抗体(Z y m e d)を塗布した。これら溶液は、X Y Zハンドリングシステム(B i o D o t 社)を用いてライン状

に塗布した。塗布後、メンブレンは室温で1晩放置により乾燥させ、クロマトメンブレンとして用いた。

【0070】

#### 5. 金コロイド粒子標識抗C<sub>o</sub>-PCBモノクローナル抗体の作製

金コロイド粒子（平均粒子径約40nm、BBInternational）への、上記方法2. で得た、抗C<sub>o</sub>-PCBモノクローナル抗体の結合は、BBInternationalのプロトコールに従い行った。得られた金コロイド標識抗C<sub>o</sub>-PCBモノクローナル抗体溶液は、OD520の値が5～6になるよう調整し、使用まで冷蔵保存を行った。

【0071】

#### 6. コンジュゲートパッド装着タイプの検出器具の組み立て

グラスファイバー製のコンジュゲートパッド（10mm×30cm、ミリポア社製）に、上記方法により得られた金コロイド標識抗体液（最終濃度：16%）を浸し、真空乾燥機で十分乾燥させたものを金コロイドパッドとして使用した。また、コットンパッド（20mm×30cm、ミリポア社製）を、2%サッカロース、1%BSAおよび1%TritonX-100を含有するPBS溶液に浸し、真空乾燥機で十分乾燥させたものを、サンプルパッドとして使用した。これらのパッドおよび上記方法4. において作成したクロマトメンブレンを、ラミネートカード（ミリポア社製）に装着し、さらに、吸収パッド（17mm×30cm、ミリポア社製）を装着後、ギロチン型カッター（BioDot社製）を用いて、ラミネートカードを、幅5mmに切断し、免疫クロマトグラフィー装置として用いた。

【0072】

#### 7. 本検出方法（本検出用セット）において用いる標識抗体と検出用器具の作製

プラスチック製の1.5mlエッペンチューブ中に、上記方法5. により得られた金コロイド標識抗体液（最終濃度：1%）およびサッカロース液（最終濃度：3%）の100μl混合液を入れ、真空乾燥機で十分乾燥させたものを、乾燥標識抗体として使用した。また、反応物接触部位として、グラスファイバーフィルター（Schleicher&Schuell）および上記方法4. において作製したクロマトメン

ブレンを、ラミネートカード（ミリポア社製）に装着し、さらに、吸収パッド（17mm×30cm、ミリポア社製）を装着後、ギロチン型カッター（BioDot社製）を用いて、ラミネートカードを、幅5mmに切断し、免疫クロマトグラフィ装置として用いた。

【0073】

8. コンジュゲートパッド装着タイプの検出用器具を利用したCo-PCB #118の検出

Co-PCB #118を、20%DMSO含有TBS溶液で、200ppm、20ppm、2ppm、0.2ppm、0.02ppmに希釈した。これらの希釈Co-PCB #118、150μLをサンプルとして、被験試料適用部位に滴下し、一定時間後（第1表参照）に検出部位の着色度合いを目視により判定した。その結果を、第1表に示す。

【0074】

【表1】

第 1 表

Co-PCB 118濃度 (ppm)	検出部位の着色度合い			
	3分後	5分後	10分後	20分後
200	—	—	+	++
20	—	—	+	++
2	—	—	+	+
0.2	—	—	—	—
0.02	—	—	—	—
0	—	—	—	—

【判定基準】 ++:強い着色 +:弱い着色 -:着色無し

【0075】

9. 本検出用器具を用いたCo-PCB #118の検出

Co-PCB #118を、20%DMSO含有TBS溶液で、200ppm、20ppm、2ppm、0.2ppm、0.02ppmに希釈した。これらの希釈Co-PCB



#118、150  $\mu$ Lを、上記方法7. で得た、乾燥標識抗体と十分に混合後、同じく、上記方法7. で得た本検出用器具の反応物接触部位に滴下し、一定時間後（第2表参照）に、検出部位の着色度合いを目視により判定した。その結果を、第2表に示す。

【0076】

【表2】

第 2 表

Co-PCB 118濃度 (ppm)	検出部位の着色度合い			
	3分後	5分後	10分後	20分後
200	—	+	++	++
20	—	+	++	++
2	—	+	++	++
0.2	—	—	+	+
0.02	—	—	—	—
0	—	—	—	—

【判定基準】 ++:強い着色 +:弱い着色 -:着色無し

【0077】

#### 10. 結果

コンジュゲートパッド装着タイプの検出用器具を利用した場合、Co-PCB #118測定サンプル滴下20分間における目視判定により、2ppm以上が陽性と判定されたのに対して、本検出用器具において、本使用方法を行った場合は、0.2ppm以上が陽性となり、従来品であるコンジュゲートパッド装着タイプの検出用器具に比べ、検出感度が10倍以上向上したことが確認された。

【0078】

#### 11. Co-PCB #118の半定量

なお、本検出用器具においても、従来品であるコンジュゲートパッド装着タイ

プの検出用器具においても、検出部位の着色度合いと、未反応標識抗体捕捉部位の着色度合いを指標にして、標的物質であるCo-PCB # 1 1 8の半定量（標的物質の存在オーダーを明らかにすることを示す）が可能であった。すなわち、まず、コンジュゲートパッド装着タイプの検出用器具において、第1表の検出部位の着色度合いに、未反応標識抗体捕捉部位の着色度合いを加味すると、第3表に示す結果が得られた。

【0079】

【表3】

第 3 表

Co-PCB 1 1 8 濃度 (ppm)	検出部位の着色度合い (右側記号)				未反応標識抗体捕捉部位の着色度合い (左側記号)			
	3 分後		5 分後		1 0 分後		2 0 分後	
2 0 0	-	-	-	-	-	+	-	++
2 0	-	-	-	-	-	+	-	++
2	-	-	+	-	+	+	+	+
0. 2	-	-	+	-	+	-	++	-
0. 0 2	-	-	+	-	++	-	++	-
0	-	-	+	-	++	-	++	-

〔判定基準〕 ++: 強い着色    +: 弱い着色    -: 着色無し

【0080】

この結果により、本例のコンジュゲートパッド装着タイプの検出用器具において、1) 未反応標識抗体捕捉部位の着色が弱いまたは確認できない状態で、検出部位の着色が強い場合は、Co-PCB 1 1 8 濃度が、2 0 ppm以上であり、2) 未反応標識抗体捕捉部位および検出部位の着色が、両者とも認められる場合は、Co-PCB 1 1 8 濃度が、2 ~ 2 0 ppmであり、3) 未反応標識抗体捕捉部位の着色が強く、検出部位の着色が確認できない場合には、Co-PCB 1 1 8 濃度が、2 ppm以下であることがわかる。

【0081】

次に、本検出用器具において、第2表の検出部位の着色度合いに、未反応標識抗体捕捉部位の着色度合いを加味すると、第4表に示す結果が得られた。

【0082】

【表4】

第 4 表

Co-PCB 1 1 8 濃度 (ppm)	検出部位の着色度合い (右側記号) 未反応標識抗体捕捉部位の着色度合い (左側記号)							
	3 分後		5 分後		1 0 分後		2 0 分後	
2 0 0	—	—	—	+	—	++	—	++
2 0	—	—	—	+	—	++	—	++
2	—	—	+	+	+	++	+	++
0. 2	—	—	+	—	++	+	++	+
0. 0 2	—	—	+	—	++	—	++	—
0	—	—	+	—	++	—	++	—

【判定基準】 ++ : 強い着色    + : 弱い着色    — : 着色無し

【0083】

この結果より、1) 未反応標識抗体補足部位の着色が、非常に弱い、または、確認できない状態で、検出部位の着色が強い場合には、Co-PCB 1 1 8 濃度が、20 ppm以上であり、2) 未反応標識抗体補足部位の着色が弱く、検出部位の着色が強い場合は、2 ~ 20 ppm、3) 未反応標識抗体補足部位の着色が強く、検出部位の着色が弱い場合は、0. 2 ~ 2 ppm、4) 未反応標識抗体補足部位の着色が強く、検出部位の着色が確認できない場合は、Co-PCB 1 1 8 濃度が、0. 2 ppm以下であることがわかる。

【0084】

【発明の効果】

本発明により、疑似陽性反応等が抑制されて、簡便であり、かつ、一層鋭敏な、被験物質中の標的物質であるダイオキシン類等の環境汚染物質に代表される低分子物質の検出手段が提供される。

【図面の簡単な説明】

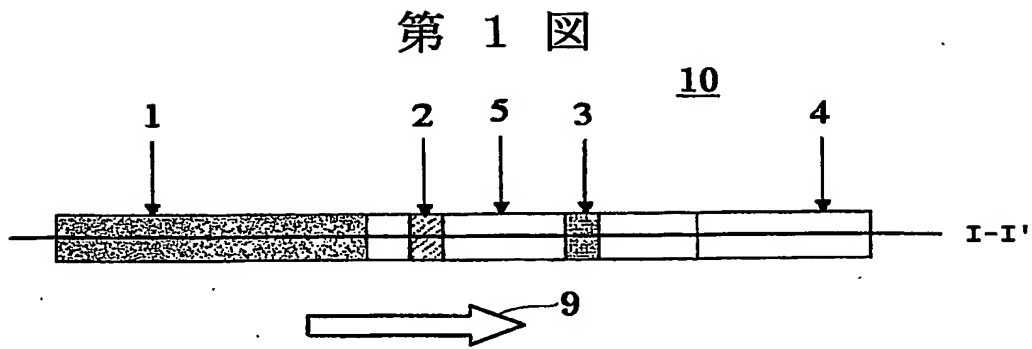
【図 1】 本検出器具の一実施態様を示した図面（上面図）である。

【図 2】 本検出器具の一実施態様を示した図面（横断面図）である。

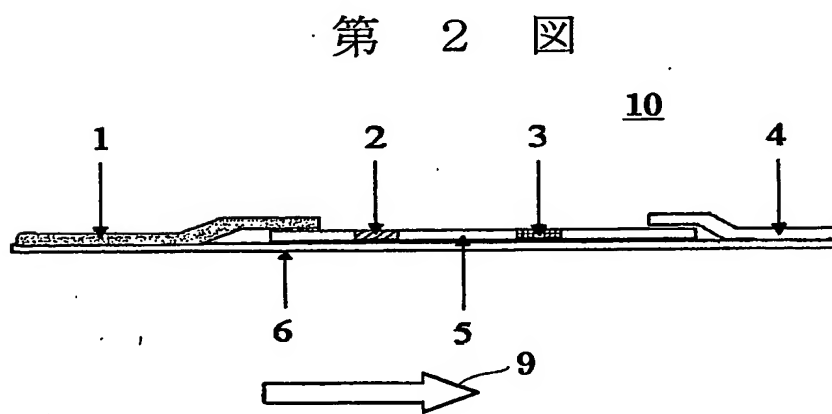
【図 3】 本検出用セットの構成要素として用いられ得る、標識抗体を封入した容器を表した図面である。

【書類名】 図面

【図 1】

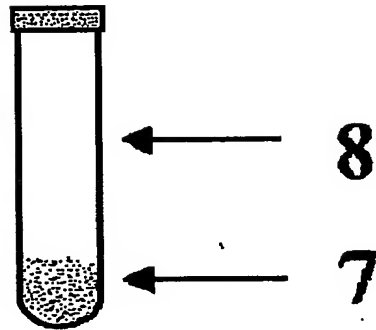


【図 2】



【図3】

# 第 3 図



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 被験物質中の標的物質であるダイオキシン類等の環境汚染物質に代表される低分子物質の、簡便かつ高感度の検出手段を提供すること。

【解決手段】 被験試料中の標的物質に結合し得る抗体を一部とする標識抗体と、被験試料の反応物を接触させるための、反応物接触部位が設けられている、被験試料中の標的物質を検出可能な、イムノクロマトグラフィーを用いた低分子物質検出用器具を用いて、上記低分子物質の検出を行うことにより、上記の課題を解決し得ることを見いだした。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [399051401]

1. 変更年月日	1999年 8月25日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都江東区青海2丁目45番地
氏 名	株式会社 エンバイオテック・ラボラトリーズ